

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.02.004

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.02.004>

SOX10 在膀胱癌细胞中促进内皮细胞增殖、迁移及成管的作用

朱文

(荆门市第二人民医院泌尿外科, 湖北 荆门 448000)

[摘要] 目的: 探讨SOX10在膀胱癌细胞中促进内皮细胞增殖、迁移和成管中的作用。方法: 利用Lipofectamine 2000在体外将SOX10 siRNA瞬时转染膀胱癌细胞株T24, 转染48 h后利用Western印迹检测T24细胞系中SOX10表达; 收集SOX10 siRNA转染的T24细胞的条件培养基, 用MTT法、Transwell法和小管形成实验观察其对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)的增殖、迁移和成管能力的影响。结果: T24细胞转染SOX10 siRNA后, SOX10蛋白表达明显降低。SOX10 siRNA转染组的条件培养基促HUVECs的增殖、迁移和成管能力较空白对照组和阴性对照组明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。结论: SOX10在膀胱癌中可通过旁分泌的方式影响内皮细胞的增殖、迁移和小管形成能力。

[关键词] SOX10; 膀胱癌; 内皮细胞; 血管新生

Effect of SOX10 in bladder cancer cells on promoting endothelial cell proliferation, migration and tube formation

ZHU Wen

(Department of Urology, Jing Men NO.2 People's Hospital, Jingmen Hubei 448000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of SOX10 on bladder cancer cells promoting human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) proliferation, migration and tube formation. **Methods:** SOX10 siRNA was transiently transfected into bladder cancer cell line T24 in vitro by Lipofectamine 2000. The expression of SOX10 was examined by Western blot 48 h after transfection. The conditioned media from SOX10-siRNA-transfected T24 cells was collected, and MTT assay, Transwell assay and tube formation assay were used to evaluate the effect of conditioned media on HUVECs proliferation, migration and tube formation. **Results:** The expression of SOX10 was decreased in T24 cells after SOX10-siRNA transfection. The effect of conditioned media from SXO10-siRNA-transfected T24 cells on proliferation, migration and tube formation of HUVECs was significantly decreased compared with blank control and negative control ($P < 0.001$). **Conclusion:** SOX10 could influence the HUVECs proliferation, migration and tube formation via paracrine in bladder cancer.

Keywords SOX10; bladder cancer; endothelial cells; angiogenesis

收稿日期 (Date of reception): 2017-12-05

通信作者 (Corresponding author): 朱文, Email: 114528069@qq.com

膀胱癌是中国最常见的泌尿系恶性肿瘤,移行细胞癌是其最常见的类型,约占所有膀胱癌的90%^[1]。膀胱癌的进展是一个复杂的多步骤过程,其中所涉及的机制仍然不明。SOX10是转录子家族SOX的一员,其能编码高迁移率家族蛋白,并与睾丸形成的决定因素SRY密切相关。SOX10最初与神经嵴细胞的分化相关。人类SOX10突变可导致Waardenburg综合征^[2]。近年来,SOX10亦涉及到肝细胞癌、膀胱癌、黑色素瘤、胃癌等的发生发展^[3-6]。SOX10在膀胱癌中过表达并与膀胱癌细胞的生物学行为密切相关。本研究采用SOX10的siRNA转染人膀胱癌移行细胞癌细胞株T24,收集其条件培养基,观察条件培养基对于人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)的增殖、迁移和成管作用。

1 材料与方法

1.1 材料

膀胱癌细胞株T24购自ATCC。SOX10的siRNA和阴性对照siRNA由上海吉玛公司合成,SOX10 siRNA序列:(sense) 5'-CCGUAUGCAGCACAAAGAAATT-3', (antisense) 5'-UUUCUUGUGCUGCAUACGGTT-3'; 阴性对照组序列:(sense) 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', (antisense) 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。DMEM培养基购自美国Hyclone公司,胎牛血清购自美国Gibco公司;SOX10抗体购自英国Abcam公司,二抗购自美国Santacruz公司,增强型化学发光试剂(ECL)购自美国Pierce公司。

1.2 siRNA的转染

对数生长期的T24细胞接种于6孔板,待细胞融合为60%~70%时以Lipofectamin 2000转染siRNA,按照操作说明书进行。Western印迹验证转染效率。

1.3 条件培养基的收集

SOX10转染组T24细胞、空白对照组和阴性对照组T24细胞按照 3×10^5 个/孔接种于6孔板,培养

24 h后更换培养基为含1% FBS的DMEM,继续培养24 h后收集条件培养基,3 000 r/min离心10 min,分装储存于-80 °C备用。

1.4 MTT法检测条件培养基对HUVECs增殖的影响

取对数生长期的HUVECs,以3 000个/孔接种于96孔板,培养24 h后更换培养基为条件培养基,继续培养48 h,实验结束前4 h加入5 mg/mL的MTT 20 μ L,培养4 h后,弃培养液,各孔加入DMSO 150 μ L,室温振荡10 min。于酶标仪570 nm波长处测定吸光度(OD)值。

1.5 迁移试验

取对数生长期的HUVECs,条件培养基重悬细胞,按 2×10^4 个/孔密度接种至Transwell小室的上室,下室内加入完全培养基。培养24 h后PBS冲洗2次,甲醇中固定2 min,晾干后于1%结晶紫染液中染色25 min。倒置显微镜下每孔随机取5个视野,计算穿至小室膜下的细胞数(放大倍数 $\times 400$)。

1.6 小管形成试验

Matrigel胶稀释1倍后加入96孔培养板中,37 °C孵箱中静置30 min,待胶凝固后加入条件培养基重悬的HUVECs(1×10^4 个/100 μ L),培养4 h,相差显微镜观察成管数(放大倍数 $\times 100$)。

1.7 Western印迹

采用RIPA裂解液裂解细胞,提取细胞总蛋白,BCA法测量蛋白浓度。SDS-PAGE,NC膜转膜,5%脱脂奶粉封闭90 min,加入兔抗人SOX10单克隆抗体(1:1000, Abcam公司)和鼠抗人 β -actin单克隆抗体(1:1000, 北京中杉金桥公司),4 °C过夜,二抗室温孵育90 min,采用化学发光法检测目的条带,并采用Image J图像分析系统对Western印迹结果进行分析。

1.8 统计学处理

所用数据采用SPSS 20.0统计学软件进行处理,定量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组数据比较采用方差分析,组间两两比较采用SNK分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SOX10-siRNA 转染对 T24 细胞中 SOX10 mRNA 和蛋白表达的影响

Western印迹结果显示SOX10-siRNA转染组T24细胞中SOX10 mRNA和蛋白的表达量与空白对照组和阴性对照组比较明显降低(图1)。

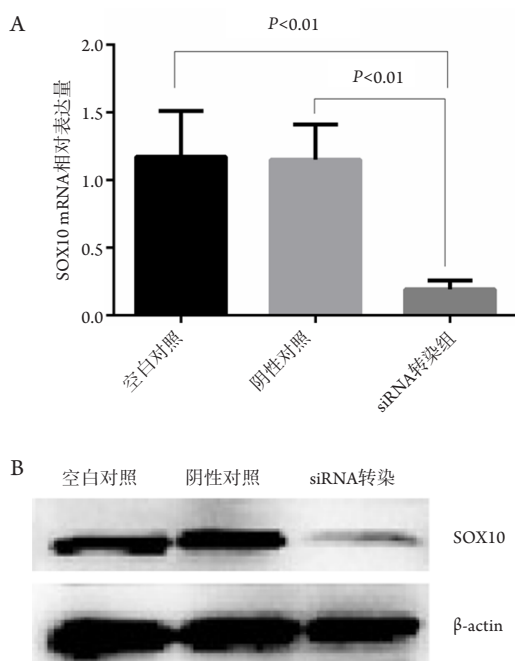


图1 SOX10 siRNA转染T24细胞后SOX10 mRNA(A)及蛋白(B)表达情况

Figure 1 SOX10 mRNA (A) and protein (B) expression in T24 cells transfected with SOX10 siRNA

2.2 SOX10-siRNA 转染 T24 细胞对 HUVECs 增殖的影响

用MTT法检测空白对照组、阴性对照组和SOX10-siRNA转染组T24细胞的条件培养基对HUVECs增殖的影响。空白对照组、阴性对照组和SOX10-siRNA转染组的OD值分别为 1.260 ± 0.093 , 1.236 ± 0.044 和 0.916 ± 0.057 , 差异有统计学意义($P < 0.001$, 图2)。SOX10-siRNA转染组明显低于空白对照组和阴性对照组, 差异有统计学意义

($P < 0.001$)。空白对照组和阴性对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

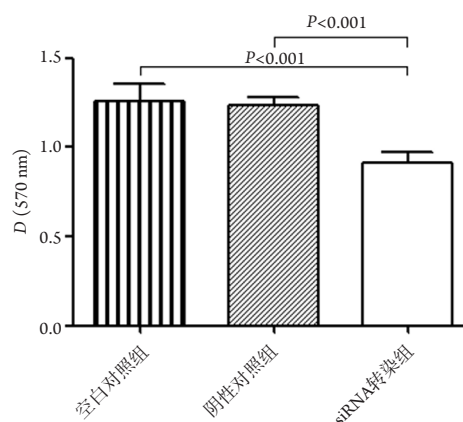


图2 SOX10 siRNA转染T24细胞后其条件培养基对HUVECs增殖的影响

Figure 2 SOX10 siRNA transfection T24 cells after conditioned medium on the proliferation of HUVECs

2.3 SOX10-siRNA 转染 T24 细胞对 HUVECs 迁移的影响

Transwell法检测空白对照组、阴性对照组和SOX10-siRNA转染组T24细胞的条件培养基对HUVECs迁移影响。SOX10-siRNA转染组迁移细胞数(25 ± 5)较空白对照组(71 ± 9)和阴性对照组(67 ± 12)明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.001$, 图3)。空白对照组和阴性对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 SOX10-siRNA 转染 T24 细胞对 HUVECs 成管的影响

Transwell法检测空白对照组、阴性对照组和SOX10-siRNA转染组T24细胞的条件培养基对HUVECs成管影响。SOX10-siRNA转染组小管形成数(8 ± 1)较对照组(14 ± 1)和阴性对照组(13 ± 2)明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.001$, 图4)。空白对照组和阴性对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

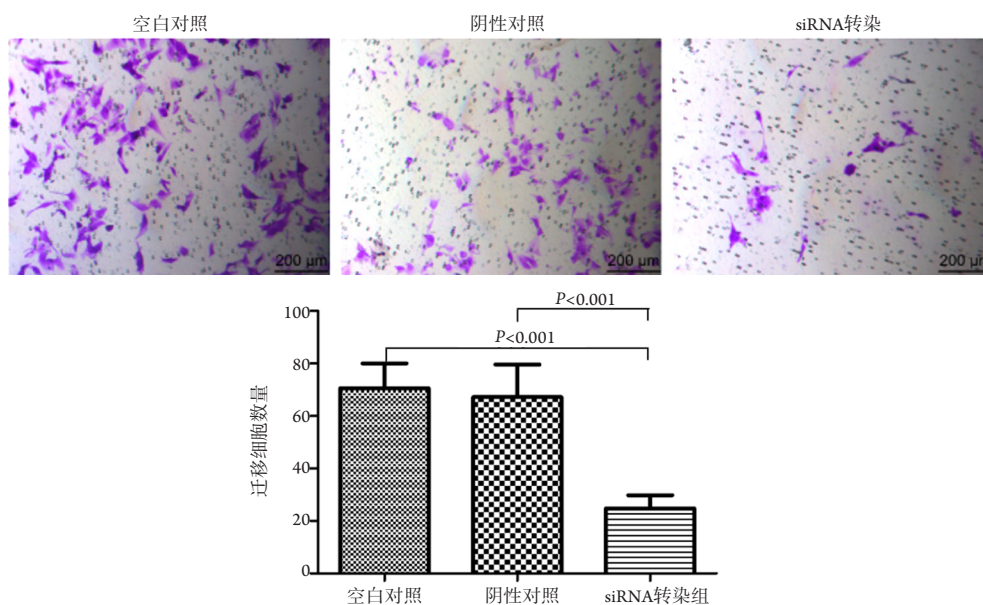


图3 SOX10 siRNA转染T24细胞后其条件培养基对HUVECs迁移的影响

Figure 3 Effect of the conditioned medium on HUVECs migration after SOX10 siRNA transfection of T24 cells

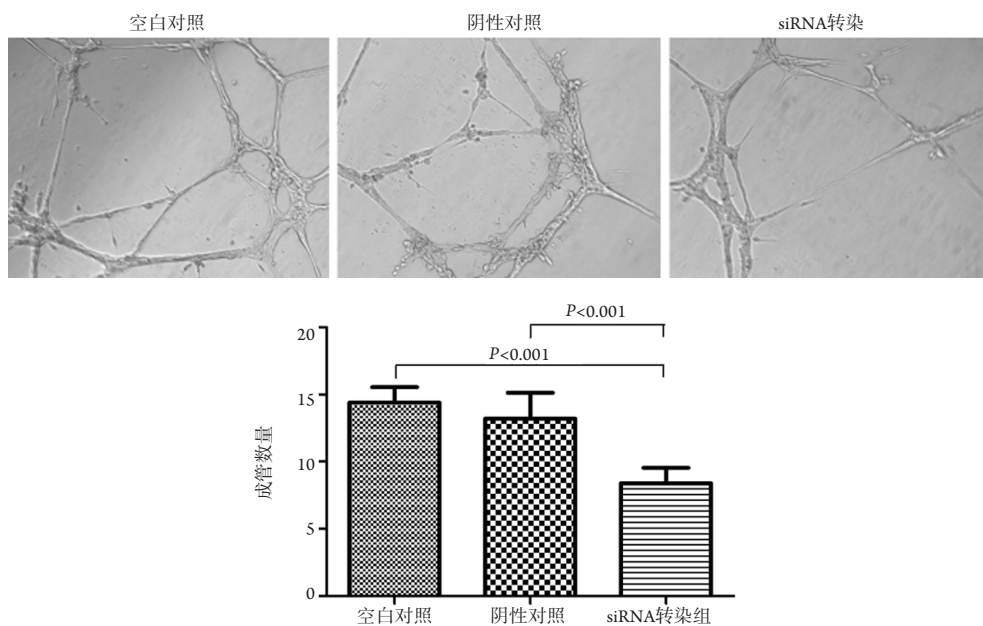


图4 SOX10 siRNA转染T24细胞后其条件培养基对HUVEC细胞成管的影响

Figure 4 Effect of the conditioned medium on HUVEC cells into tubes after SOX10 siRNA transfection of T24 cells

3 讨论

SOX10作为转录因子通过结合和激活目的基因来调节各种细胞分化过程，尤其是在神经嵴衍生物和成人神经系统发展过程中。近年来，大量证据^[7]表明：SOX10异常表达可见于各种疾病，包括肿瘤。异常表达的SOX10与肿瘤进展密切相关，并

涉及肿瘤细胞的生物学行为。SOX10在不同的肿瘤类型中作用机制也不相同。在肝细胞癌和鼻咽癌中，SOX10作为一个肿瘤促进剂而在消化道肿瘤中却是肿瘤抑制剂^[3,8]。SOX10可通过诱导Nestin的表达调节三阴性乳腺癌的肿瘤干细胞特征^[9]。SOX10在卵巢癌中高表达，细胞核中SOX10的表达是卵巢癌预后的独立危险因素^[10]。SOX10在腺囊癌中肿

瘤干细胞样细胞的增殖和放疗抵抗中发挥关键作用^[11]。Fbxw7 α 可通过泛素化介导的降解调节SOX10的稳定性,介导黑色素瘤细胞的迁移^[12]。亦有报道^[4]显示:膀胱癌中SOX10过表达并与患者临床病理特征密切相关,并提示预后差。因此SOX10可作为膀胱癌预后的分子标志物潜在的分子靶点。SOX10在肿瘤的生物行为中发挥重要作用,但SOX10是否涉及肿瘤的血管新生未见报道。

血管新生过程包括一系列步骤,如刺激内皮细胞、周围毛细血管内皮基板的降解、内皮细胞迁移、毛细血管出芽形成和血管成熟^[13]。血管新生在恶性肿瘤中发挥必要作用。肿瘤的特征之一为肿瘤细胞可分泌可扩散的细胞因子来诱发毛细血管出芽和生长,毛细血管进而提供氧气和新的营养物质来支持周围肿瘤的生长^[14]。因此,通过抑制肿瘤血管新生来治疗肿瘤已经达到共识。本研究结果显示:敲低膀胱癌细胞中SOX10表达后,其条件培养基促进HUVECs的增殖、迁移和成管能力明显降低。结果表明SOX10在膀胱癌的血管新生中发挥重要作用。肿瘤的进展与肿瘤细胞分泌到周围环境中的分子密切相关。分泌分子能够通过自分泌或旁分泌方式靶向作用于其他细胞,参与细胞的增殖、生存、免疫逃逸、血管新生和转移。分泌的蛋白组学是一套复杂的分泌分子,包括各种细胞蛋白,通过典型或不典型的分泌方式,例如胞外分泌和外来体转运^[15]。敲低膀胱癌细胞中SOX10表达后,其分泌到细胞外的蛋白质组学发生变化,引起肿瘤血管新生的胞外因子成分发生改变,但本研究未对相关因子进行检测,这或许是以后的研究重点。

综上所述,SOX10可通过影响HUVECs的增殖、迁移和小管形成在膀胱癌的血管新生中发挥重要作用,SOX10或许可作为膀胱癌血管新生靶向治疗的位点。

参考文献

- Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, et al. Bladder cancer[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17022.
- Jalilian N, Tabatabaiefar MA, Alimadadi H, et al. SOX10 mutation causes Waardenburg syndrome associated with distinctive phenotypic features in an Iranian family: A clue for phenotype-directed genetic analysis[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2017, 96: 122-126.
- Zhou D, Bai F, Zhang X, et al. SOX10 is a novel oncogene in hepatocellular carcinoma through Wnt/ β -catenin/TCF4 cascade[J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(10): 9935-9940.
- Yin H, Qin C, Zhao Y, et al. SOX10 is over-expressed in bladder cancer and contributes to the malignant bladder cancer cell behaviors[J]. *Clin Transl Oncol*. 2017 Aug;19(8):1035-1044.
- Gambichler T, Petig AL, Stockfleth E, et al. Expression of SOX10, ABCB5 and CD271 in melanocytic lesions and correlation with survival data of patients with melanoma[J]. *Clin Exp Dermatol*, 2016, 41(7): 709-716.
- Kato M, Nishihara H, Hayashi H, et al. Clinicopathological evaluation of Sox10 expression in diffuse-type gastric adenocarcinoma[J]. *Med Oncol*, 2017, 34(1): 8.
- Ordóñez NG. Value of SOX10 immunostaining in tumor diagnosis[J]. *Adv Anat Pathol*, 2013, 20(4): 275-283.
- Zhao Y, Liu ZG, Tang J, et al. High expression of Sox10 correlates with tumor aggressiveness and poor prognosis in human nasopharyngeal carcinoma[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 1671-1677.
- Feng W, Liu S, Zhu R, et al. SOX10 induced Nestin expression regulates cancer stem cell properties of TNBC cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 485(2): 522-528.
- Kwon AY, Heo I, Lee HJ, et al. Sox10 expression in ovarian epithelial tumors is associated with poor overall survival[J]. *Virchows Arch*, 2016, 468(5): 597-605.
- Panaccione A, Chang MT, Carbone BE, et al. NOTCH1 and SOX10 are essential for proliferation and radiation resistance of cancer stem-like cells in adenoid cystic carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(8): 2083-2095.
- Lv XB, Wu W, Tang X, et al. Regulation of SOX10 stability via ubiquitination-mediated degradation by Fbxw7 α modulates melanoma cell migration[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(34): 36370-36382.
- Shi YN, Zhu N, Liu C, et al. Wnt5a and its signaling pathway in angiogenesis[J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 471: 263-269.
- Rajabi M, Mousa SA. The role of angiogenesis in cancer treatment[J]. *Biomedicines*, 2017, 5(2): E34.
- Jerez S, Araya H, Thaler R, et al. Proteomic analysis of exosomes and exosome-free conditioned media from human osteosarcoma cell lines reveals secretion of proteins related to tumor progression[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(2): 351-360.

本文引用: 朱文. SOX10在膀胱癌细胞中促进内皮细胞增殖、迁移及成管的作用[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(2): 246-250. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.02.004

Cite this article as: ZHU Wen. Effect of SOX10 in bladder cancer cells on promoting endothelial cell proliferation, migration and tube formation[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(2): 246-250. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.02.004